

原 著

ラット大腿動脈における ボツリヌストキシン A 型による 血行動態変化について

昭和大学医学部形成外科学講座

佐藤 雅秀 清水 祐紀 林 稔
横山 才也 吉本 信也

要約：ボツリヌストキシン A 型（以下，BTX-A）は神経接合部においてアセチルコリンの放出を抑制し，筋の収縮力を弱め，痙攣を抑制する．こうした働きを利用し本邦では，眼瞼痙攣，片側顔面痙攣，痙性斜頸などの治療や表情じわ治療などの美容治療の応用がされている．また，BTX-A の投与による周囲組織の血流増加作用が指摘されており，末梢血管障害の治療の可能性を示唆している．今回われわれは，ラットの大腿動脈に BTX-A の投与を行い，レーザードップラー血流計（PERIMED 社，PeriFluxSystem5000）を用いて血行動態の変化について計測を行った．ラットの大腿動脈の中心部に 10-0 針付きナイロン糸で 1 針かけて結紮し，部分的に血管を狭窄させ，血流を減少させた血管狭窄モデルラットを作成した．BTX-A 薬剤として Xeomin（Merz Pharmaceuticals, Greensborough, North Carolina）を使用した．試薬として生理食塩水 0.02 ml に Xeomin をそれぞれ 0.5 U，1 U，2 U，4 U，8 U 溶かした溶液を作成し，血管狭窄モデルラットの結紮部の血管周膜内にそれぞれの試薬を投与した．また同部位に生理食塩水 0.02 ml を投与したものをコントロールとした．結紮部より約 10 mm 末梢の大腿動脈の血流を結紮前，結紮後，投与 3 日目にレーザードップラー血流計を使用し計測した．1 U 群，2 U 群，4 U 群，8 U 群において投与 3 日目で著しく血流の増加を認めた．0.5 U 群，コントロール群においては血流の明らかな変化を認めなかった．ラットにおいて血管周膜内に 1 U 以上の BTX-A の投与が有意に血流を改善させる効果があるということが示唆された．BTX-A を血流改善を目的とした薬剤として使用するにあたり，その効果として作用時間や拡散の程度などの更なる研究による解明が必要であると考えた．

キーワード：ボツリヌストキシン A 型，Xeomin，レーザードップラー血流計，血管狭窄モデルラット，血行動態

ボツリヌストキシン A 型（以下，BTX-A）はボツリヌス菌によって産生される神経毒素であり，神経筋接合部においてアセチルコリンの放出を抑制し筋の収縮力を弱める¹⁾．また間接的に神経興奮を静めることにより痙攣などを抑制する．本邦ではこうした働きを利用して眼瞼痙攣，片側顔面痙攣，痙性斜頸，小児脳性麻痺患者における下肢痙攣に伴う尖足の治療が報告されている²⁾．また，その作用は美容治療にも応用され，65 歳未満の成人における眉間の表情じわの治療や筋肉の運動制限による廃用性委縮を利用した輪郭形成，アセチルコリン分泌抑制作用を利用した多汗症治療など多岐にわたる効果を認めている³⁾．近年，BTX-A の投与による周囲組

織の血流増加作用が指摘されており，臨床応用として末梢血管障害の治療につながる可能性を示唆している⁴⁾．今回われわれは，ラットの大腿動脈周囲への BTX-A の投与を行い，レーザードップラー血流計を用いて血行動態の変化について計測を行い，検討を行った．

研究 方法

1. 動物とその飼育

本実験に際し，昭和大学医学部動物実験委員会の承認を得た．実験動物には体重 350 ～ 400 g の雄性 Sprague-Dawley rat を計 30 匹用いた．

2. 実験モデルの作成および方法

ラットをジエチルエーテル (Wako) で沈静化した後、ペントバルビタールナトリウム (共立製薬) 30 mg/kg を腹腔内投与し麻酔を行った⁵⁾。ラットの下腹部を剃毛し、仰臥位に固定した後、鼠径部を皮膚切開し大腿動脈を露出させた。大腿動脈の径の中心部に 10-0 針付きナイロンで 1 針かけて結紮し、部分的に血管を狭窄させ、血流を減少させた血管狭窄モデルラットを作成した (Fig. 1)。ボツリヌストキシン A 型薬剤として Xeomin (Merz Pharmaceuticals, Greensborough, North Carolina) を使用した。試薬として生理食塩水 0.02 ml に Xeomin をそれぞれ 0.5 U, 1 U, 2 U, 4 U, 8 U 溶かした溶液を作成した。血管狭窄モデルラットの結紮部の血管周膜内にそれぞれの試薬を投与し (Fig. 2)、それぞれ 0.5 U 群, 1 U 群, 2 U 群, 4 U 群, 8 U 群とした。また同部位に生理食塩水 0.02 ml を投与したものをコントロール群とした。ラットはそれぞれの群に対して 5 匹ずつとした。血流測定にはレーザードップラー血流計 (PERIMED 社, PeriFluxSystem5000) を使用した。結紮部より約 10 mm 末梢の大腿動脈の血流を結紮前, 結紮直後, 投与 3 日後にレーザードップラー血流計を使用し血流を計測した。測定時は振動によるブレを軽減するため支柱を用いレーザードップラー血流計のプロープの先端が大腿動脈に軽く接するように固定した。また、レーザーの乱反射を軽減するために大腿動脈測定部の後面に着色テープを置いた (Fig. 3)。測定値はラットの大腿動脈にプロープをあて、10 分間の安静を保ち、その後 1 分間の計測値の平均値をとった。レーザードップラー血流計で測定された血流値は Perfusion Unit (Blood Perfusion = Concentration of Moving Blood Cells \times Mean Velocity of these Cells) の単位で示された。

3. 統計学的解析

統計処理には Mann-Whitney test を用い、危険率 5% 未満をもって有意差とした。

結 果

1. 血管狭窄モデルラット

実験で使用した 30 匹のラットそれぞれにおける安静時の大腿動脈の血流値は異なっていたが、すべてのラットにおいて結紮前と結紮直後の血流値で有

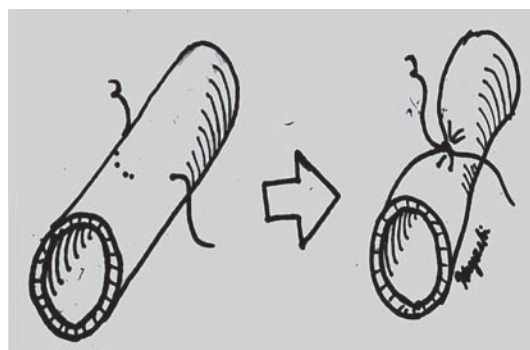


Fig. 1 The way to make a model rat of blood vessel stenosis.

The center of the path of a femoral artery was made to ligate partially using 10-0 nylon thread, which decreased the blood flow was made.

意差を認め、血流の減少を認めた。

2. Xeomin による血流の変化

コントロール群のすべてのラットにおいて、結紮直後と投与 3 日目の血流値で有意差は認めなかった ($p = 1$) (Fig. 4)。

また、0.5 U 群のすべてのラットにおいて、結紮直後と投与 3 日目の血流値で有意差は認めなかった ($p = 0.5476$) (Fig. 5)。

1 U 群のすべてのラットにおいて、結紮直後と投与 3 日目の血流値で有意差を認め、血流の増加を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 6)。

2 U 群のすべてのラットにおいて、結紮直後と投与 3 日目の血流値で有意差を認め、血流の増加を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 7)。

4 U 群のすべてのラットにおいて、結紮直後と投与 3 日目の血流値で有意差を認め、血流の増加を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 8)。

8 U 群のすべてのラットにおいて、結紮直後と投与 3 日目の血流値で有意差を認め、血流の増加を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 9)。

1 U 群, 2 U 群, 4 U 群, 8 U 群において、結紮直後と投与 3 日目の血流値の増加率は、1 U 群 157 ~ 372 % (平均 208.6 %), 2 U 群 145 ~ 228 % (平均 197.8 %), 4 U 群 200 ~ 352 % (平均 259.0 %), 8 U 群 206 ~ 282 % (平均 253.4 %) であり、それぞれの投与群間の血流値の増加率においても有意差を認めなかった ($p > 0.05$)。

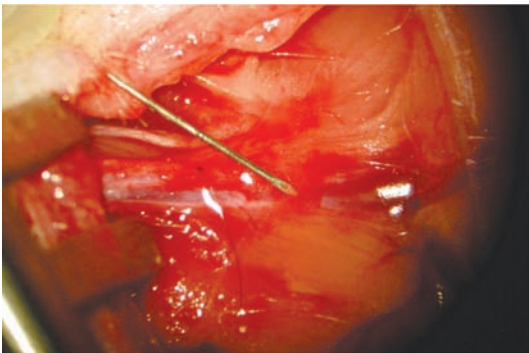


Fig. 2 Xeomin diluted to normal concentration was injected for the model rat into the blood vessel circumference film of the ligation part of a femoral artery.

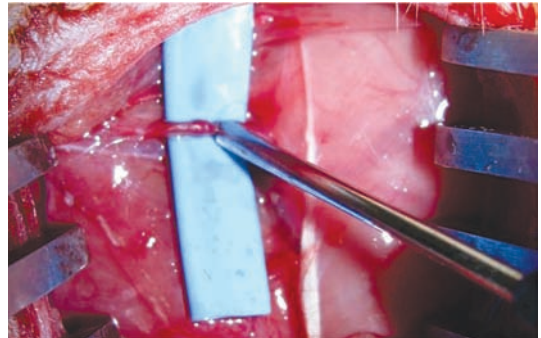


Fig. 3 The blood flow was measured by using Laser Doppler blood-flow meter.
The probe was applied to the femoral artery of rats.

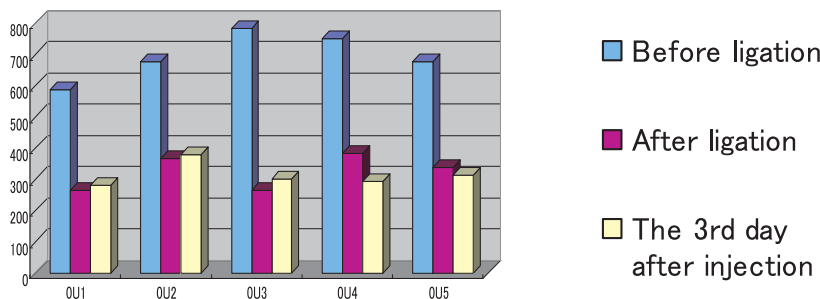


Fig. 4 The hemodynamic change of five rats of control group was shown in the graph with blood flow value.

The significant difference did not accept in after a blood vessel ligation and the 3rd day after injection. ($p = 1$)

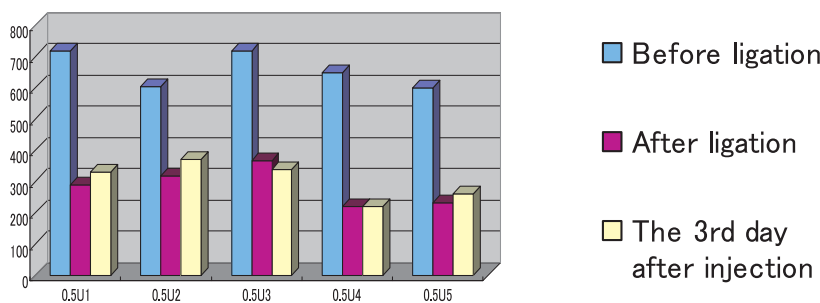


Fig. 5 The hemodynamic change of five rats of a 0.5 U group was shown in the graph with blood flow value.

The significant difference did not accept in after a blood vessel ligation and the 3rd day after injection. ($p = 0.5476$)

考 察

ボツリヌス毒素はボツリヌス菌が産生する毒素で

あり、A型からG型までの7型が知られている。A型毒素は長く効果が持続し、活性が最も高く、現在ボツリヌス毒素で唯一薬剤として使用されている¹⁾。

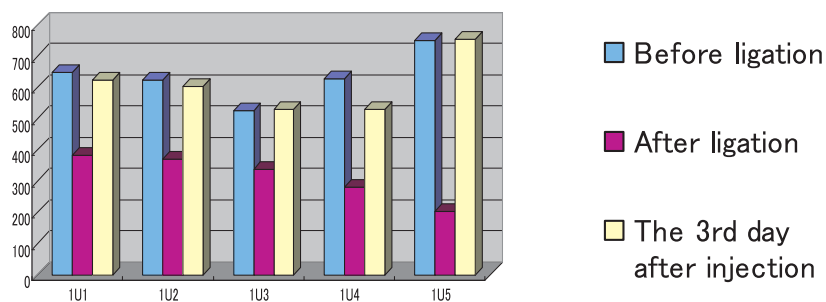


Fig. 6 The hemodynamic change of five rats of 1 U group was shown in the graph. The statistically significant accept in after a blood vessel ligation and the 3rd day after injection. ($p < 0.05$)

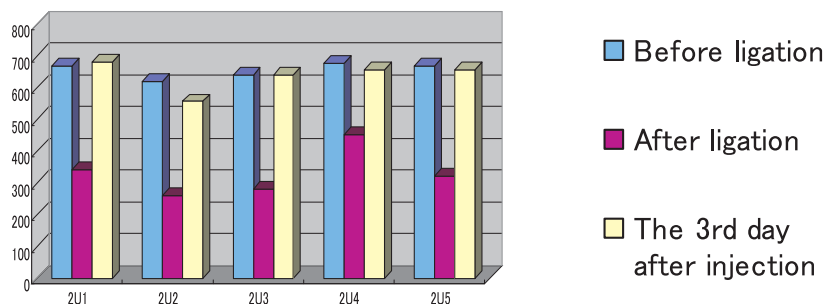


Fig. 7 The hemodynamic change of five rats of 2 U group was shown in the graph with blood flow value. The statistically significant accept in after a blood vessel ligation and the 3rd day after injection. ($p < 0.05$)

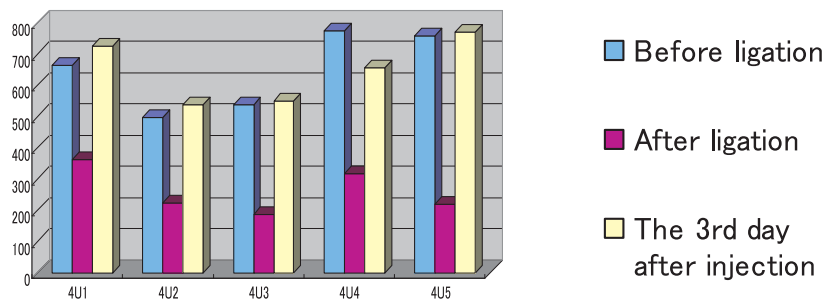


Fig. 8 The hemodynamic change of five rats of 4 U group was shown in the graph with blood flow value. The statistically significant accept in after a blood vessel ligation and the 3rd day after injection. ($p < 0.05$)

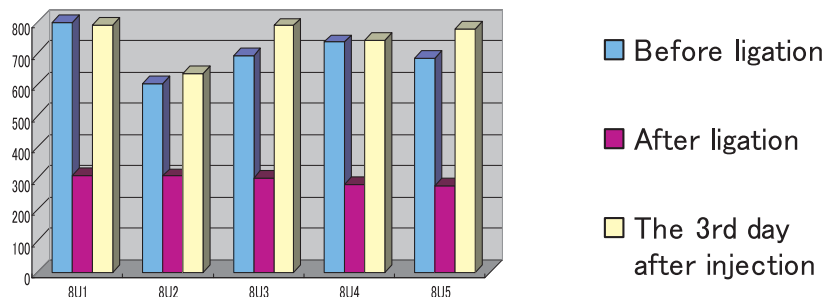


Fig. 9 The hemodynamic change of five rats of 8 U group was shown in the graph with blood flow value. The statistically significant accept in after a blood vessel ligation and the 3rd day after injection. ($p < 0.05$)

BTX-A は 1920 年代に精製法が発見されたが、実際に臨床での応用は 1973 年の Scott らによる斜視治療の報告からである^{3,6)}。その後、米国で 1989 年に世界で最初に治療薬としての承認が得られた。本邦では 1996 年に眼瞼痙攣に対する治療薬として薬事承認を受け導入された⁷⁾。現在では、数種類の BTX-A 薬剤が販売されているが、薬事承認を受け、通常の医薬品と同様に国内で流通しているのは BOTOX[®] (以下、ボトックス) のみである³⁾。近年、国外において BTX-A 薬剤でボトックスより複合タンパクが少ないため抗体が出来づらく、また常温保存が可能な Xeomin の使用が増えてきており、Xeomin を使用した研究報告が見られるようになってきた⁸⁾。

本実験では抗体産生による効果の誤差を少なくするため Xeomin を使用した。本実験においてラットの血管周膜内に 1 U 以上の BTX-A の投与が血流値を有意に増加させる効果があることがわかった。血流値は血管径もしくは血流速度に依存しており、血管径の拡大もしくは血流速度の上昇により血流値が増加すると考えられる。現在、治療で行われている BTX-A の局所投与での効果範囲は投与液の量により変化し、多ければより広範囲に浸潤する³⁾。本実験での BTX-A の投与量は 0.02 ml と微量であり、血管周膜内に投与しているため、周囲組織に広く浸潤し、血流速度の上昇が起こったとは考えにくい。つまり、血管径が拡張し血流値の上昇がみられたことが示唆される。今後、組織学的に血管径や薬剤浸潤の範囲を計測し評価する必要があると考える。

また BTX-A は大変毒性の強い神経毒である⁶⁾ ため、安全に使用するには適切な使用量を明確にする必要がある。本実験においてコントロール群、0.5 U 群では BTX-A 投与後 3 日目の血流値に有意な変化が見られなかったことより、効果は濃度に依存することが示唆される。しかし、1 U 群、2 U 群、4 U 群、8 U 群では血流値の増加率に有意な変化はなかつ

た。つまりラットの大腿動脈においては BTX-A 薬剤を 1 U 投与が血流改善の効果が得られ、かつ最も安全であると考えられる。

他国において手術後の血管攣縮治療、予防に対し BTX-A 薬剤を使用し効果があった⁹⁾ との報告があるが血流改善を目的とした BTX-A の投与はまだ見られておらず、作用機序も明らかになっていない。BTX-A は血流改善の薬剤として使用するために効果・拡散の程度、安全に使用するための投与量、明確な作用機序について更なる研究による解明が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 目崎高広：入門講座ボツリヌス療法 臨床神経生理学の立場から (2)。臨床脳 50：625-630, 2008.
- 2) 野倉一也：神経内科でのボツリヌス毒素(ボトックス[®]) 治療。現代医 58：49-56, 2010.
- 3) 土井秀明：しわ治療 ボツリヌストキシン療法。PEPARS 27：1-8, 2009.
- 4) Matic DB, Lee TY, Wells RG, *et al*: The effects of botulinum toxin type A on muscle blood perfusion and metabolism. *Plast Reconstr Surg* 120：1823-1833, 2007.
- 5) 門田 聡, 横山才也, 橋川正利, ほか：ラット浅腹壁動脈に対するリドカイン血管外局所投与による血流変化と血管攣縮予防の検討。昭和医学会誌 70：136-142, 2010.
- 6) Scott AB, Rosenbaum A, Collins CC, *et al*: Pharmacologic weakening of extraocular muscles. *Invest Ophthalmol* 12：924-927, 1973.
- 7) 目崎高広：入門講座ボツリヌス療法 臨床神経生理学の立場から (1)。臨床脳 50：559-564, 2008.
- 8) Carli L, Moncecucco C and Rossetto O: Assay of diffusion of different botulinum neurotoxin type A formulations injected in the mouse leg. *Muscle Nerve* 40：374-380, 2009.
- 9) Van Beek AL, Lim PK, Gear AJ, *et al*: Management of vasospastic disorders with botulinum toxin A. *Plast Reconstr Surg* 119：217-226, 2007.

THE HEMODYNAMIC CHANGE OF BOTULINUM TOXIN TYPE A ON FEMORAL ARTERY IN THE RAT

Masahide SATO, Yuki SHIMIZU, Minoru HAYASHI,
Toshiya YOKOYAMA and Shinya YOSHIMOTO

Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Showa University School of Medicine

Abstract — Botulinum toxin type A (BTX-A) affects the discharge of acetylcholine in a nerve junction, weakens the contractile force of muscles and controls a spasms. BTX-A is used in medical treatment, such as the treatment of a blepharospasm, a hemifacial spasm, spasmodic torticollis, etc... and it also is used in cosmetics medical treatment of expression wrinkles. Moreover, the increased blood flow facilitated by BTX-A has been pointed out, and the possibility of its use in the medical treatment of peripheral vascular disorder has been suggested. We applied BTX-A medication to the femoral artery of the rat, and measured the hemodynamic change using a Laser Doppler blood flow meter. The center of the path of the femoral artery became partially ligated which consequently decreased the blood flow. Xeomin was used as the BTX-A medicine. Xeomin (0.5 U and 1 U, 2 U, 4 U, 8 U) was dissolved in 0.02 ml of physiologic saline, and each reagent, diluted to normal concentration, was injected into the model rat femoral artery where the blood vessel circumference film for ligation was positioned. Moreover, the part was medicated with 0.02 ml of physiological saline as control. The blood flow of the femoral artery was measured before ligation, after ligation and on the 3rd day after injection. In 1 U, 2 U, 4 U, and 8 U group, a marked increase in blood flow was seen by the 3rd day after injection. An apparent change of the blood flow was seen in 0.5 U group or the control group. It was suggested that the effect that BTX-A injection of 1 U or more facilitates blood flow improvement as noted by blood vessel circumference film in the rat. Further research regarding the action time, the grade of diffusion, etc. is necessary in order to use BTX-A as a medicine aimed at a blood flow improvement.

Key words: Botulinum toxin type A, Xeomin, Laser Doppler blood flow meter, Model rat of blood vessel stenosis, Hemodynamic

〔受付：2月9日，受理：2月16日，2012〕